

## Comunicación breve

### Actividad farmacológica de la fracción de esteroides y alcoholes triterpénicos aislada del aceite de oliva virgen

Por R. de la Puerta<sup>2</sup>, R. Maestro-Durán<sup>1</sup> y V. Ruiz-Gutiérrez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de la Grasa (C.S.I.C.). Apartado 1078, 41012 Sevilla.

<sup>2</sup> Dpto. Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Farmacología, Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla.

#### RESUMEN

##### Actividad farmacológica de la fracción de esteroides y alcoholes triterpénicos aislada del aceite de oliva virgen

La fracción de esteroides y alcoholes triterpénicos obtenida por cromatografía en capa fina a partir del insaponificable del aceite de oliva virgen ha sido ensayada para evaluar su posible actividad farmacológica en relación a su efecto antiinflamatorio. La administración tópica de estos productos produjo un potente efecto antiedematoso, en el edema auricular provocado por la aplicación de TPA (acetato de tetradecanoilforbol) en animales de experimentación. Este test ha sido ampliamente utilizado para evaluar la acción antiinflamatoria de inhibidores de la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub>. La medida de la mieloperoxidasa, enzima marcador del acúmulo de neutrófilos en el tejido dérmico inflamado, mostró un alto poder inhibitorio sobre la infiltración celular ejercida por la fracción ensayada.

**PALABRAS-CLAVE:** Aceite de oliva virgen – Actividad antiinflamatoria – Alcohol triterpénico – Esterol.

#### SUMMARY

##### Pharmacological activity of the fraction isolated from virgin olive oil containing the sterols and triterpenic alcohols

The fraction of sterols and triterpenic dialcohols from unsaponifiable of virgin olive oil has been tested for its possible antiinflammatory activity. The topical administration of these products produced a potent antioedematous effect, in the auricular oedema induced by TPA (12-O-tetradecanoylphorbol acetate) in experimental animals. This test has been widely used to determine the antiinflammatory action of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors. The measure of myeloperoxidase, marker enzyme of the accumulation of neutrophils in the inflamed tissue, demonstrated a significant reduction of the cellular infiltration produced by assayed fraction.

**KEY-WORDS:** Antiinflammatory activity – Sterol – Triterpene alcohol – Virgin olive oil.

#### 1. INTRODUCCIÓN

La fracción insaponificable de los aceites vegetales se considera minoritaria con respecto a la fracción glicérica, sin embargo puede ejercer una gran influencia en las propiedades biológicas de cada aceite. De hecho, la terapia inmunosupresiva en numerosas enfermedades inflamatorias se asocia, no exclusivamente al efecto de los ácidos grasos que se liberan tras la manipulación de la dieta con aceite ricos en ácidos grasos poliinsaturados, sino a otros componentes, probablemente los componentes menores o insaponificables (Calder, 1994). Prueba de ello, el eritrodiol (alcohol triterpénico que se encuentra en el insaponificable del aceite de oliva) ha sido descrito recientemente con un inhibidor de la enzima elastasa lisosomal de leucocito humano (Ying, 1994).

Con este trabajo, hemos querido demostrar el efecto farmacológico que sobre procesos inflamatorios, presentan ciertos componentes minoritarios característicos de la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen, como son los esteroides y los alcoholes triterpénicos. El análisis de la fracción de esteroides es muy importante ya que su contenido varía de un aceite a otro. En el oliva virgen, el contenido en esteroides no es mayor de 160 mg/kg, y el compuesto mayoritario de esta fracción es el  $\beta$ -sitosterol, constituyendo entre el 76-86% del insaponificable. Los dioides triterpénicos presentes en la fracción son eritrodiol y uvaol cuyas concentraciones respectivas son 6-10 y 18 mg/kg de aceite.

#### 2. PARTE EXPERIMENTAL

##### 2.1 Muestras

Fracción de esteroides y alcoholes triterpénicos obtenidos del insaponificable de aceite de oliva virgen por cromatografía en capa fina.

## 2.2 Material y Reactivos

### *Aislamiento del insaponificable*

Material y reactivos descritos en la norma UNE 55004, necesario para la separación del insaponificable por el método del óxido dietílico (capítulo 4 de la norma).

### *Cromatografía en capa fina*

Cromatofolios de sílice G Merck, cubeta de vidrio para el desarrollo de placas, estufa de desecación, microjeringas, lámparas ultravioleta. Revelador: solución 2-7-dicloro-fluoresceína al 0,1% en etanol del 90%; éter etílico y hexano de calidad «para análisis».

### *Animales de experimentación*

Se utilizaron ratones Swiss de unos 25-20 g de peso, que se agruparon en lotes de 6.

### *Reactivos químicos*

Indometacina (Sigma), acetato de tetradecanoilforbol (Sigma).

## 2.3 Procedimiento de obtención de la fracción

Las placas cromatográficas se activan en estufa de desecación a 105-110°C, durante 1 h. En la placa activada se depositan gotitas finas del insaponificable obtenido disuelto en éter insopropílico, con ayuda de una microjeringa, cubriendo una línea situada a unos 2 cm del borde inferior de la placa. La distribución deberá hacerse uniformemente, efectuando las pasadas que sean necesarias para depositar la totalidad del insaponificable. El solvente de desarrollo fue hexano-éter etílico 2:1 (v/v). Una vez efectuado el desarrollo se pulveriza la placa con el reactivo de revelado y se examina a la luz ultravioleta (366 nm).

La banda horizontal correspondiente a la mezcla de esteroides y alcoholes triterpénicos, se rasca con una espátula, el polvo de sílice se coloca en minicolumnas de vidrio y el contenido orgánico se eluye con alcohol isopropílico. El producto obtenido una vez evaporado el disolvente constituyó la fracción a ensayar.

## 2.4 Edema auricular producido por TPA

Seguimos la técnica de De Young (1989). El edema fue inducido en la oreja derecha del ratón, por la aplicación tópica de 2.5µg de TPA por oreja disuelto en acetona. Las distintas dosis utilizadas: 0,25, 0,50 y 1,0 mg de la fracción a ensayar fueron disueltas en etanol del 70%, y fueron aplicadas tópicamente, inmediatamente después de la aplicación de TPA. Las orejas izquierdas (controles) fueron tratadas con el vehículo (etanol 70%). Como patrón de referencia se empleó indometacina a una dosis de 0,5 mg/oreja. Pasadas 4 horas de la aplicación tópica, los animales

fueron sacrificados y se procedió a seccionar (6 mm) y pesar la porción central de las orejas. El valor del edema se calculó por diferencia de peso entre las orejas tratadas (derechas) y las no tratadas (izquierdas), así mismo se calculó la inhibición del edema (expresado en %) frente al grupo control.

## 2.5 Inhibición de la enzima mieloperoxidasa

La actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) fue ensayada utilizando los homogenizados de las orejas inflamadas, según técnica de Susuki (1983), modificada por De Young (1989). Las medidas de absorbancia se realizaron a 665nm de longitud de onda, en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3. La inhibición enzimática (expresada en %) se corresponde con las diferencias de absorbancias observadas respecto al grupo control.

## 2.6 Análisis estadísticos

Los resultados se presentan como la media de los valores obtenidos en cada lote de animales  $\pm$  error estándar. La significación estadística se realizó con el test de la «t» de Student.

## 3. RESULTADOS

La fracción de esteroides y alcoholes triterpénicos mostró una potente actividad antiinflamatoria tópica en el test del edema auricular producido por TPA en oreja de ratón, observándose una clara inhibición del edema en una relación dosis-dependiente (Tabla I). Los valores de inhibición obtenidos son similares a los producidos con la indometacina utilizada como patrón de referencia. La actividad de la enzima mieloperoxidasa, indicadora de la infiltración leucocitaria fue significativamente inhibida ( $p < 0,001$ ) a las tres dosis ensayadas (Tabla II).

Tabla I

### Inhibición del edema auricular producido por TPA

	Dosis (mg/aplicación)	Edema (mg)	Inhibición (%) Edema
Control (TPA)	0.0025	20.56 $\pm$ 0.78	-
Patrón (Indometacina)	0.50	2.28 $\pm$ 0.73 ***	88.91
Fracción	0.25	7.56 $\pm$ 1.15 ***	63.23
Fracción	0.50	3.52 $\pm$ 0.63 ***	82.87
Fracción	1.00	1.84 $\pm$ 0.73 ***	91.05

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; «t» de Student frente al control

Tabla II  
Inhibición de la enzima mieloperoxidasa en el test del edema producido por TPA

	Dosis (mg/aplicación)	Diferencia Abs. (nm)	Inhibición (%)
Control (TPA)	0.0025	0.928±0.09	-
Patrón (Indometacina)	0.50	0.043±0.02 ***	95.36
Fracción	0.25	0.312±0.03 ***	66.38
Fracción	0.50	0.217±0.03 ***	76.61
Fracción	1.00	0.000±0.00 ***	100.00

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; «t» de Student frente al control

#### 4. DISCUSIÓN

Una respuesta positiva en el test del TPA indicaría que la inhibición del edema podría ser esencialmente debida a un bloqueo de la proteína quinasa C(PKC). El TPA estimula la acción de esta proteína quinasa de una manera similar a aquella producida por diacilglicerol endógeno, liberado de los fosfolípidos de membrana (Nishizuka, 1984). Como consecuencia de la estimulación de la PKC se activan otras enzimas como la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que induce la liberación del ácido araquidónico, originando un aumento de los niveles de prostaglandinas E<sub>2</sub> y la aparición de edema (Carlson, 1985). Por lo tanto, la inhibición producida por la fracción ensayada sobre la inflamación inducida por este agente irritante, podría ser debida al bloqueo de una o varias de las enzimas relacionadas con la liberación y metabolismo del ácido araquidónico.

Diferentes compuestos de estructura triterpénica de origen natural, como betulina y ácidos betulínico y ursólico, han demostrado poseer un efecto antiinflamatorio tópico, presentando un mecanismo de acción relacionado con el que poseen los glucocorticoides (Recio, 1994).

Por otro lado, la fracción inhibió muy significativamente la actividad de la enzima mieloperoxidasa, indicadora de la infiltración de neutrófilos en el tejido inflamado. Esta potente inhibición sobre el edema y también sobre la actividad de mieloperoxidasa ha sido

descrita para fármacos tipo corticosteroides (De Young, 1989). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que los esteroides y triterpenos tienen una estructura relacionada, y a menudo han sido utilizados como precursores en la síntesis de estos fármacos.

Por tanto, el efecto antiinflamatorio tópico observado con esta subfracción esterólica/triterpénica del insaponificable procedente de aceite de oliva virgen, nos pone de manifiesto la acción beneficiosa que estos componentes minoritarios pueden ejercer sobre determinados estados patológicos.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con fondos del proyecto ALI-95-0073, de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

Gracias por la ayuda técnica a D. Manuel Rodríguez-Aguilar y a Dña. Fernanda Leone.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Calder, P. C., Yaqoob, P., Newsholme, E. A. (1994). —«Triacylglycerol metabolism by lymphocytes and the effect of triacylglycerol on lymphocyte proliferation». — *Biochem. J.* **298**, 605-611.
- Carlson, R. P., O'Neill-Davis, L., Chang, J., Lewis, A. J. (1985). —«Modulation of mouse, ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacological agents». — *Agents and Actions* **17**, 197-204.
- De Young, L. M., Kheifets, J. B., Ballaron, S. J., Young, J. M. (1989). —«Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents». — *Agents Actions* **26**, 335-341.
- Nishizuka, Y. (1984). —«The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion». — *Nature* **308**, 693-698.
- Recio, M. C., Giner, R. M., Mañez, S., Gueho, J. Julien, H. R., Hostettmann, K., Ríos, J. L. (1995). —«Investigations on the steroidal antiinflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*». — *Planta Med.* **61**, 9-12.
- Susuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T. (1983). —«Assay method for myeloperoxidase in polymorphonuclear leukocytes». — *Anal. Biochem.* **132**, 345-352.
- Ying, Q. L., Rinehart, A. R., Simon, S. R., Cheronis, J. C. (1991). —«Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid». — *Biochem. J.* **277**, 521-526.

Recibido: Noviembre 1996

Aceptado: Enero 1997